

Отзыв официального оппонента

на диссертацию Хантимировой Лейсан Маратовны «Получение хитозана, его производных, изучение их физико-химических характеристик и иммуноадьювантной активности в составе инактивированных вакцин против гриппа», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – Вирусология и 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Хантимировой Лейсан Маратовны посвящена получению хитозанов и его производных с различными физико-химическими характеристиками, изучению их иммуноадьювантных свойств в составе инактивированных вакцин против гриппа человека и животных. Несмотря на то, что идея использования хитозанов в качестве адьювантов уже поднималась и отдельные публикации на эту тему имеются, тем не менее, до сих пор, остаются неясными, во-первых, механизмы иммуномодулирующего действия хитозана, а во-вторых, даже неоднозначна терминология в отношении данного вещества. Известно, что хитозан, как линейный полимер с нерегулярным расположением остатков глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, может иметь различную молекулярную массу, отличаться по степени деацетилирования и индексу полидисперсности, характеризующего его однородность. Иными словами, хитозаны различаются по своим физико-химическим характеристикам и это важно учитывать при изучении механизмов проявления ими биологической активности. Поэтому, разработка методов и приемов получения хитозанов с определенными физико-химическими характеристиками является актуальным направлением в биотехнологии, а разработка новых вакцин с повышенной иммуноадьювантной активностью – в сфере профилактики вирусных инфекций.

В этой связи, цель и поставленные для ее достижения задачи весьма актуальны на современном этапе развития науки, а их решение будет иметь существенное практическое значение.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Достоверность научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения и определяется значительным объемом проведенных экспериментов, а также использованием широкого спектра современных аналитических методов исследования. Эксперименты грамотно спланированы и выполнены, а обработка их результатов осуществлена с привлечением адекватных методов статистического анализа.

Степень научной новизны представленной работы достаточно высока. Так, соискатель впервые, используя ферментный комплекс, полученный культивированием *Myceliophthora fergusi*, осуществила процесс ферментативного получения хитозана с молекулярной массой 10 кДа при степени деацетилирования 85%. характеризующегося низким индексом полидисперсности (ИП 2,01) и низким содержанием остаточного белка (<0,2%).

Впервые изучена адьювантная активность образцов хитозана, полученных способами ферментативного, кислотного гидролиза и реацетилирования при близких значениях их индекса полидисперсности и степени деацетилирования. Установлено, что адьювантные свойства хитозанов в составе экспериментальных инактивированных моновалентных цельновирионных вакцин для профилактики гриппа возрастают с повышением молекулярной массы и степени деацетилирования.

Экспериментально доказано, что производные хитозана, в частности сукцинил-хитозаны не проявляют иммуноадьювантных свойств.

И, наконец, предложен адъювант-кандидат на основе хитозана 700 кДа, СД 85%, который по иммуноадъювантной активности превосходит гидроксид алюминия, и сравним с адъювантами в виде суспензии и эмульсии на основе сквалена и токоферола.

Таким образом, безусловно, получены новые данные, характеризующие возможность и перспективность использования хитозанов в качестве иммуноадъювантов.

Ценность полученных результатов для науки и практики

Результаты, полученные в работе Хантимироваой Лейсан Маратовны, имеют существенную теоретическую и практическую значимость, поскольку в ходе выполненного исследования получены новые знания о способности хитозанов с различными физико-химическими характеристиками проявлять иммуноадвантную активность в составе инактивированных вакцин.

Адъювант-кандидат на основе хитозана (ММ 700 кДа; СД 85%) может найти применение при изготовлении не только вакцин против гриппа, но и других противовирусных вакцин, в том числе и для ветеринарии.

Предложенный автором метод ферментативного получения субстанций хитозана с заданными физико-химическими характеристиками и высокой степенью чистоты может быть использован в биотехнологии хитозанов биомедицинского назначения.

Содержание диссертации

Диссертационная работа изложена на 84 страницах, иллюстрирована 16-ю рисунками и документирована 13-ю таблицами экспериментальных данных. Структура диссертации традиционна и состоит из введения, обзора литературы по теме исследования, описания использованных материалов и методов исследования, представления полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, который представлен 63 источниками, две трети из которых англаязычные.

И, наконец, предложен адъювант-кандидат на основе хитозана 700 кДа, СД 85%, который по иммуноадъювантной активности превосходит гидроксид алюминия, и сравним с адъювантами в виде суспензии и эмульсии на основе сквалена и токоферола.

Таким образом, безусловно, получены новые данные, характеризующие возможность и перспективность использования хитозанов в качестве иммуноадъювантов.

Ценность полученных результатов для науки и практики

Результаты, полученные в работе Хантимироваой Лейсан Маратовны, имеют существенную теоретическую и практическую значимость, поскольку в ходе выполненного исследования получены новые знания о способности хитозанов с различными физико-химическими характеристиками проявлять иммуноадъювантную активность в составе инактивированных вакцин.

Адъювант-кандидат на основе хитозана (ММ 700 кДа; СД 85%) может найти применение при изготовлении не только вакцин против гриппа, но и других противовирусных вакцин, в том числе и для ветеринарии.

Предложенный автором метод ферментативного получения субстанций хитозана с заданными физико-химическими характеристиками и высокой степенью чистоты может быть использован в биотехнологии хитозанов биомедицинского назначения.

Содержание диссертации

Диссертационная работа изложена на 84 страницах, иллюстрирована 16-ю рисунками и документирована 13-ю таблицами экспериментальных данных. Структура диссертации традиционна и состоит из введения, обзора литературы по теме исследования, описания использованных материалов и методов исследования, представления полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, который представлен 63 источниками, две трети из которых англоязычные.

Введение содержит обоснование актуальности проведенного исследования. Этот раздел также включает формулировку цели и задач выполненной работы, суть ее научной новизны и практическую значимость.

В представленном обзоре литературы соискателем представлена краткая информация о профилактике гриппа с помощью вакцин, об используемых адьювантах в составе вакцин, в том числе об адьювантах на основе хитозана. Вся информация изложена настолько кратко, что занимает объем текста в 12 страниц.

В разделе «Материалы и методы исследования» дана краткая характеристика использованных в работе исходных хитозанов, способов их подготовки и очистки, ферментативного гидролиза, реацетилирования, а также методов оценки их физико-химических характеристик. Достаточно кратко, но информативно изложены методы работы с животными и культурами клеток, методы наработки вирусов и определения их биологической активности. Следует отметить, что использованные в работе методы вполне адекватны поставленным задачам исследований и соответствуют современному аналитическому уровню. Все экспериментальные данные обработаны с помощью программы SPSS Statistics (IBM, USA).

В разделе «Результаты исследования» автор приводит данные собственных исследований, которые изложены в трех главах и подразделах диссертационной работы, суть которых состоит в получении субстанций хитозанов, различающихся по молекулярной массе, степени деацетилирования, их очистки от белков и токсинов для дальнейшей оценки их иммуноадьювантной активности. В итоге всех проведенных экспериментов, автором был предложен адьювант-кандидат, который является хитозаном с молекулярной массой 700 кДа и СД 85%. По иммуноадьювантной активности данный кандидат превосходит

используемый до сих пор гидроксид алюминия и сравним с перспективными препаратами на основе сквалена.

Важно, что изложение результатов исследования завершено разделами «Обсуждение результатов» и «Заключение», в которых, в краткой форме, обобщаются полученные результаты в сравнении с результатами других исследователей и отмечаются наиболее значимые моменты.

Сформулированные в работе научные положения, выводы, рекомендации и заключения, обоснованы и соответствуют полученным экспериментальным данным.

Материалы, изложенные в диссертации, опубликованы в 4-х статьях в рецензируемых научных журналах из списка ВАК, явились научной основой получения патента на изобретение РФ и зарегистрированной заявки на изобретение, находящейся в настоящий момент на стадии экспертизы. Всего по материалам исследований опубликовано 20 научных работ.

Вместе с тем, в процессе ознакомления с диссертационной работой возникли некоторые критические замечания.

1. Касается положений, выносимых на защиту. По п.1 синтаксическая ошибка: «Способ гидролиза (чего, какого субстрата?) с использованием...». По п.2-5, - на мой взгляд, защищаемые положения не сформулированы, а представляют собой констатацию фактов проведения тех или иных исследований и получения тех или иных результатов и практически повторяют выводы. И еще, в порядке нумерации этих положений дважды обозначен п.4.
2. В разделе «Материалы и методы» Вы пишете: «Адьюванты на основе хитозана готовили как 1,0% растворы в глутаминовой кислоте...» (стр.9 автореферата, стр.32 диссертации). Глутаминовая кислота, представляет, из себя кристаллическое вещество. Растворимость глутаминовой кислоты в воде 7,5 г/л. Очевидно речь

идет о растворе глутаминовой кислоты в воде? Тогда следовало указать молярность такого раствора, или концентрацию в % мас.

3. В этом же разделе Вы указываете, что для ферментного гидролиза (опять же, какого вещества?) использовали ФП, содержащий комплекс высокоактивных карбогидраз, продуцируемый мицелиальным грибом *Myceliophthora fergusi* UV-64 DRV F-239D. Однако абсолютно не представлены характеристики этого ферментного препарата, что это лиофильно высушенный концентрат культуральной жидкости или препарат, полученный другим способом сушки? Какова его активность в отношении хитина/хитозана? Вам кто-то его предоставил или Вы его нарабатывали сами? Если последнее, необходимо было представить условия культивирования, состав питательной среды и технологию получения данного препарата, что не заставило бы оппонента искать эти сведения в Ваших же публикациях.
4. Замечание общего характера, как к тексту автореферата, так и диссертации. Чрезмерно излишнее количество аббревиатур и сокращений. Поверьте, это не только затрудняет восприятие материала, но и желание его читать, если бы не официальная обязанность это сделать. Тем более что в списке сокращений отсутствуют разъяснения, что такое M_v , M_w и M_n . Хотя в тексте диссертации можно найти их смысловое значение. Но для многих M_n , это химический элемент.

Ряд вопросов, требующих разъяснений.

1. Чем Вы можете объяснить, что в процессе переосаждения исходного коммерческого хитозана M_M 1000 кДа наблюдается снижение M_M до 700 кДа, а в процессе переосаждения хитозана с M_M 200 кДа такого не происходит?

2. При подборе условий ферментативного гидролиза хитозанов Вы остановились на рН 5,6 (табл.6 в диссертации) и температуре 55°C (табл.7 там же), хотя, как следует из динамики, хитозаназная активность с повышением этих показателей продолжала возрастать. Почему вы не определили точку перехода динамики в обратную сторону?
3. В таблице 8 (стр.39 в диссертации) представлены данные о влиянии соотношения Фермент : Субстрат на молекулярную массу продуктов гидролиза. Обычно в энзимологии такое соотношение принято выражать в ед. активности фермента на г (массу) или моль субстрата. В первой колонке таблицы у Вас представлено соотношение ферментного препарата мг/ г хитозана. Во второй колонке представлены соотношения, которые из данных первой колонки арифметически не получаются. Объясните в чем дело? Лично я нашел объяснение, подняв ваши публикации. Почему Вы не привели данные, в каких единицах рассчитано соотношение Фермент : Субстрат?

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты данной диссертационной работы рекомендуется использовать для создания новых высокоэффективных вакцин против различных типов антигенов. Необходимо продолжить исследований механизмов иммунологического действия хитозана в качестве адьюванта, характеристики профиля иммунного ответа и иммунофенотипа, оценки соотношения «доза-эффект» путем изучения эффекта комбинации различных

доз адъюванта с различными дозами антигена. Конкретно для вакцин против гриппа человека с предложенным адъювантом-кандидатом (хитозан с ММ 700 кДа и СД 85%), необходимым представляется проведение доклинических испытаний.

Заключение

Диссертационная работа Хантимировой Лейсан Маратовны «Получение хитозана, его производных, изучение их физико-химических характеристик и иммуноадъювантной активности в составе инактивированных вакцин против гриппа» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, по своей актуальности, научной новизне и практической значимости соответствующей требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – Вирусология и 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).


Научный руководитель учреждения, главный научный сотрудник
лаборатории прикладной микробиологии

Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии
наук, Министерства науки и высшего образования РФ.

доктор биологических наук по специальностям

03.02.03 Микробиология и 03.01.04 Биохимия,

профессор



Александр Иванович Мелентьев

« 15 » ноября 2019 г.

450054, Республика Башкортостан, г. Уфа, Проспект Октября, д. 69

Телефон 8(347) 235-56-55, e-mail: mlnt@anrb.ru

Подпись Мелентьева Александра Ивановича заверяю:

Заместитель директора УИБ УФИЦ РАН, доктор биологических наук

« 15 » ноября 2019 года

